

IV CONGRESSO NAZIONALE AIUC TORINO 2005
RUOLO DELL'INGEGNARIA TESSUTALE

A. Scalise,

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Tissue engineering è la scienza che studia la realizzazione di tessuti semiartificiali con proprietà meccaniche e fisiologiche del tutto uguali a quelle "originali". Si distingue dall'ingegneria genetica perché le cellule, pur riprodotte in grande quantità in laboratorio, provengono dallo stesso paziente sul quale verranno innestate e avendo inoltre, un patrimonio genetico intatto e invariato, sono prive del rischio di rigetto e di contaminazione virale.

La guarigione delle ferite è un fenomeno complesso ma ordinato che coinvolge diversi processi. Un'esempio di riparazione delle ferite è fornito dalla guarigione per prima intenzione di un'incisione chirurgica, con morte di un numero limitato di cellule epiteliali e connettivali e l'interruzione della continuità della membrana basale. Nei primi minuti vi è la formazione di un coagulo, contenente fibrina e cellule ematiche; la disidratazione della parte superficiale forma la ben nota crosta, che ricopre la ferita.

Entro le 24 ore, fase dell'infiammazione, i neutro-fili compaiono ai margini dell'incisione, muovendosi verso il coagulo di fibrina, e l'epidermide si ispessisce grazie all'attività mitotica delle cellule basali.

Entro le 24-48 ore, fase della proliferazione, gemme di cellule epiteliali crescono dai bordi, migrano lungo i margini del derma, depositando nel loro movimento componenti della membrana basale. Infine si fondono al centro della ferita, sotto la superficie della crosta, producendo uno strato epiteliale continuo ma sottile.

Entro il terzo giorno i neutrofili sono stati in larga misura sostituiti dai macrofagi, importanti costituenti del tessuto di granulazione, che invade progressivamente lo spazio, e responsabili dell'eliminazione dei detriti extracellulari, della fibrina e di altro materiale estraneo nella sede di riparazione. Queste cellule inoltre, elaborano TGF-beta, PDGF e beta-FGF, promuovendo quindi la migrazione e la proliferazione dei fibroblasti. Fibre di collagene appaiono ai margini, ma disposte verticalmente e quindi non ancora idonee a saldare i lembi della ferita. Continua la proliferazione delle cellule epiteliali che aumentano lo spessore dello strato epidermico.

Entro il quinto giorno lo spazio dell'incisione è riempito da tessuto di granulazione. Le fibre collagene divengono più abbondanti, saldando solo ora i lembi della ferita. La sintesi di collagene è stimolata da fattori di crescita (TGF-beta, PDGF, FGF) e citochine (IL-1, IL-4) che vengono scerete dai leucociti e dai fibroblasti, nelle ferite in via di guarigione. L'aumento netto della quantità di collagene è controllato anche a livello della sua degradazione. L'epidermide ritrova il suo normale spessore e il differenziamento cellulare porta alla cheratinizzazione della superficie.

Durante la seconda settimana si ha continuo accumulo di collagene e proliferazione di fibroblasti. L'infiltrato leucocitario, l'edema e l'eccesso di vascolarizzazione sono in larga misura scomparsi. Inizia il lungo processo di schiarimento, dovuto all'aumento del collagene all'interno della cicatrice e accompagnato dalla regressione dei canali vascolari. La migrazione dei fibroblasti nella sede del danno e la loro susseguente proliferazione, sono innescate da diversi fattori di crescita, tra cui TGF-beta, PDGF, EGF, FGF dalle citochine fibrogeniche, interleuchina (IL-1) e TNF-alfa. Tra le fonti di questi fattori di crescita ci sono le piastrine e diverse cellule infiammatorie, oltre all'endotelio attivato e macrofagi. Se sono presenti stimoli chemiotattici appropriati, anche i mastociti, gli eosinofili e i linfociti possono aumentare di numero. Ognuno di queste cellule può contribuire direttamente o indirettamente alla migrazione e alla proliferazione dei fibroblasti. Il TGF-beta, prodotto da cellule del tessuto di granulazione, sembra avere il ruolo più importante per la moltitudine di effetti: induce la migrazione e la proliferazione dei fibroblasti, l'aumento della sintesi di collagene e fibronectina e riduzione della degradazione della matrice extracellulare ad opera di metalloproteasi. Il TGF-beta ha anche un'azione chemiotattica per i monociti e induce angiogenesi, forse richiamando i macrofagi.

Alla fine del primo mese la cicatrice è costituita da un tessuto connettivo cellulare, privo di infiltrato infiammatorio, ricoperto da epidermide intatta. Gli annessi dell'epidermide e del derma non rigenerano e può rimanere una cicatrice di tessuto connettivo denso al posto della trama di collagene presente nel derma intatto.

Alcuni dei fattori di crescita (PDGF, FGF) che stimolano la sintesi del collagene e di altre molecole del tessuto connettivo, modulano anche la sintesi e l'attivazione delle metalloproteasi (prodotti da macrofagi, neutrofili, fibroblasti), enzimi che degradano questi componenti della matrice extracellulare. Il bilancio netto di sintesi e degradazione definisce il rimodellamento del tessuto connettivo.

Se la perdita di sostanza è più cospicua, si ha inevitabilmente una maggiore quantità di fibrina, di detriti necrotici e di essudato, che devono essere rimossi. Di conseguenza la reazione infiammatoria è più intensa.

Si formano maggiori quantità di tessuto di granulazione e compare il tipico fenomeno della contrazione della ferita ascritto, almeno in parte, alla presenza di miofibroblasti, fibroblasti modificati aventi le caratteristiche ultrastrutturali di cellule muscolari lisce.

Le lesioni in cui è più indicato il trattamento con innesti autoioghi coltivati sono le lesioni croniche, definite "difficili" con le terapie convenzionali, che appaiono congelate nella fase infiammatoria o proliferativa. Sono ferite profonde, estese, con margini irregolari, non tendenti alla guarigione spontanea; sono gravi perdite di sostanza dermo-epidermica determinate da molteplici cause. I fattori di crescita, peptidi della classe delle citochine (PDGF), appaiono diminuiti nelle lesioni croniche per ridotta sintesi, aumentata distruzione, deficit recettori e per inattivazione.

Dopo un lungo periodo di ricerca, durato circa 15 anni, si è potuto realizzare una matrice biointegrata, a base di polimeri derivati dall'acido ialuronico, sulla quale si seminano i cheratinociti e i fibroblasti prelevati dal paziente. L'acido ialuronico nella cute sana è presente in quantità e facilita l'idratazione, influenza la mobilità e la proliferazione cellulare; mentre nella cute in cui sono in atto processi riparativi aumenta notevolmente la sua concentrazione facilitando la crescita e il differenziamento cellulare. In natura questo zucchero si trova in forma di gel non lavorabile, ma dal 1997, grazie a una piccola manipolazione strutturale (esterificazione del polisaccaride naturale con alcol benzilico), è stato tradotto nello stato solido ed è quindi in grado di essere elaborato in una grande varietà di forme fisiche, quali garze, fili, matrici tridimensionali di supporto per il derma, a lamine per i cheratinociti.

È in grado di garantire una corretta organizzazione tridimensionale con adesione, proliferazione e produzione dei pre-costituenti dermo-epi-dermici. I requisiti importanti di questa impalcatura tridimensionale sono la biocompatibilità, ossia la possibilità del tessuto di essere riconosciuto come proprio biodegradabilità, ossia la capacità della matrice di venire riassorbita dai tessuti con i quali viene in contatto (entro 4 settimane), senza lasciare tracce tossiche e senza determinare rischiose reazioni infiammatorie o sensibilizzanti.

Il protocollo di trattamento prevede una fase pre innesto durante la quale si procede alla biopsia cutanea (circa 2x2 cm) a tutto spessore, prelevata da un'area non lesionata e inviata, contenuta in un kit apposito, ai laboratori. I fibroblasti ottenuti dalla biopsia cutanea, proliferano nel corso della fase della coltura primaria, della durata di 8 giorni, vengono quindi seminati su una trama tridimensionale dove, in 7 giorni, proliferano e iniziano a produrre i costituenti della matrice extracellulare del derma. I fibroblasti autoioghi vengono coltivati in presenza di proteine non omologhe: è siero fetale bovino proveniente da allevamenti controllati e certificati. In seguito all'applicazione, sul letto della ferita, continuano a proliferare fino a formare un letto dermale granuleggiante e ben vascolarizzato, quindi idoneo, all'innesto di lamine di cheratinociti autoioghi.

I cheratinociti proliferano anch'essi nel corso della fase della coltura primaria, in 8 giorni; vengono quindi seminati su una lamina perforata dove in alcuni giorni proliferano fino a raggiungere la condizione di pre-confluenza. L'epitelio autologo viene coltivato in presenza di cellule, fibroblasti murini resi non proliferanti mediante irraggiamento e di proteine non omologhe (lo stesso siero fetale bovino utilizzato per i fibroblasti). Le colture epiteliali innestate continuano a proliferare e a migrare attraverso le microperforazioni per colonizzare il letto della ferita.

Durante la fase pre-innesto si procede alla bonifica dei possibili foci infettivi, che richiede tampone microbiologico con antibiogramma-topobiogramma o antisetticogramma della zona lesa. Se viene riscontrata l'infezione, il paziente dovrà essere trattato con antisettici topici opportuni e con antibiotici locali o sistemici.

Tra le medicazioni antisettiche possiamo utilizzare Amuchina al 2-5%, acido Borico al 3%, Nitrito di Ag 0,5-2%, Permanganato di K 0,5% o Sulfadiazina di Ag. Tra gli antibiotici locali: Gentamicina, Clin-damicina, Meclociclina (l'allergia da contatto è assai remota). L'antibiotico terapia per via sistemica è indicata solo nei casi di infezione clinicamente evidenti.

L'ulteriore passo è il debridement chirurgico. Eventuali residui di fibrina o di tessuto necrotico devono essere accuratamente rimossi attraverso curet-tage chirurgico che cruentando il fondo della ferita creerà, inoltre, le condizioni per un più rapido attecchimento dell'innesto. Se nel debridement è stata utilizzata l'elettrocoagulazione è consigliato aspettare 1-2 giorni.

Nella fase dell'innesto, che ha inizio 15 giorni dopo il prelievo biotico, si utilizza una soluzione antisettica per allestire il campo sterile, quindi la soluzione fisiologica per lavarlo via. Si procede applicando il sostituto dermale, prelevato con 2 pin-i è sottòVi a pviTAA arrolòTiàata, òiretiamente SIA ionào della lesione. È sempre opportuno evitare di spostarlo perché la forza di trazione, esercitata su una superficie così delicata, può danneggiare le cellule. Se l'area da ricoprire richiede l'applicazione di più innesti, è necessario che questi siano posti a stretto contatto reciproco. Dopo l'applicazione, l'area deve essere coperta con garza sterile, non aderente, di tipo non medicato, tenuta in situ con un bendaggio lievemente compressivo, di tipo tradizionale. Per circa 10 giorni non si deve trattare la sede dell'innesto con farmaci topici o altri agenti di cui non sia noto l'effetto citotossico. Durante lo stesso periodo è opportuno limitare al minimo le sollecitazioni meccaniche che possono provocare dislocazioni. Per alcuni distretti corporei, come il calcagno, l'avam-piede e aree in prossimità di articolazioni è consigliato l'utilizzo di apparecchi di scarico o l'impiego di particolari precauzioni atte a proteggere il sito d'innesto.

In settima giornata si può rimuovere il biomateriale già in via di biodegradazione e in decima giornata, su un fondo granuleggiante, viene applicato il sostituto epidermale. La medicazione potrà essere rinnovata a partire dal quinto giorno dall'innesto, poiché il neo-epitelio è in proliferazione e differenziazione per formare gli strati multipli tipici del normale epitelio. Solo nel caso di accertata infezione in situ, si rimuove subito l'innesto e si procede con la terapia idonea.

// management prevede visite bisettimanali. - L'importante in questa tecnica risulta essere l'approccio multidisciplinare per consentire la riduzione della morbilità e il trattamento delle patologie di base.

Il protocollo di valutazione deve contemplare lo score di Wagner e l'assessment vascolare: colore, termotatto, claudicano intermittens, polsi periferici; doppler arteriosi, ossimetria transcutanea (inferiore a 10 mmHg equivale a ischemia critica, superiore a 30 mmHg ha invece una prognosi favorevole); indice di Winsor, arteriografia, ecocolor-Doppler secondo i casi.

Le indicazioni riguardano ferite che non danno segni di riepitelizzazione dopo almeno 60 giorni. Rientrano tra queste le ulcere con diverse eziologie: diabetiche (I e II tipo; importante nel "piede diabetico" in quanto è causa frequente di amputazione non traumatica nell'arto inferiore); neuropatiche o neuroischemiche; ulcere con grado di Wagner dal I al II (III e IV solo dopo bonifica chirurgica); ulcere arteriose, venose, miste, linfatiche, flebotattiche, post-flebitiche, post-trombotiche, post-traumatiche (deiscenze o cheloidi), ustioni, ulcere post-scleroterapia (inestetismi), epatopatiche, emopoietiche (talassemie), connettivopatie, radio-dermite, stravasamento chemioterapico, panarterite nodosa.

Le controindicazioni riguardano soprattutto le piaghe da decubito in allettati, dove l'indicazione è sempre un lembo miocutaneo piuttosto che un innesto;

sedi soggette a movimenti, con scarsa compliance del paziente o dove non è possibile l'utilizzo di docce o gambaletti; l'ulcera infetta; margini lesionali sottominati, dove è necessario appianare prima la lesione recintando i margini; la presenza di un fondo se-cernente; l'esposizione ossea e tanto più l'osteome-lite; neoplasie e gravidanza.

Le alternative a questa tecnica sono gli innesti cutanei autoioghi liberi tradizionali; free flap; skin span-ders; guarigione per seconda intenzione; plastica cutanea di scorrimento; chirurgia arterovenosa; OTI (ossigeno terapia iperbarica); ozono terapia.

Gli auto-innesti tradizionali sono innesti one-step (utilizzando mesh-graft) con prelievi senati eseguiti in chirurgia d'urgenza e con pratica chirurgica cruenta. Le problematiche degli innesti tradizionali sono molteplici e riguardano sia le aree donatrici che le riceventi, Per le prime vi è senza dubbio un danno ja-trogeno, spesso accompagnato da ritardo nella riparazione tissutale o da anomalie della cicatrizzazione.

Nei casi di ustione, con interessamento di ampie aree di superficie corporea, la difficoltà principale è la scarsa disponibilità di aree donatrici.

Per quanto riguarda le aree riceventi, le problematiche legate all'innesto autologo sono: l'infezione, il sieroma, l'ematoma, il danno iatrogeno o un letto della ferita non idoneo.

I vantaggi dell'ingegneria dei tessuti: è una metodica semplice, che richiede una biopsia in anestesia locale con uno strumentario comune, soprattutto è minimo il trauma ed il disagio del paziente. Inoltre vi è il vantaggio di poter riparare ampi difetti cutanei con la possibilità di più innesti sequenziali, con un'unica biopsia, non precludendo altre metodiche; ha bassi tempi di guarigione e di ospedalizzazione (spesso è possibile effettuarlo in regime di day ospital o DRG) e un rapido recupero sociale.